

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN
MASTER I FARMASI

**ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON
AV PEPTIDER**

*Peptidegenskapenes innvirkning på
ekstraksjonsutbyttet*

Anne Guro Hatterud



Faggruppen for legemiddelanalyse,
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO
Våren 2010

ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON AV PEPTIDER

*Peptidegenskapenes innvirkning på
ekstraksjonsutbyttet*

Anne Guro Hatterud

Masteroppgaven ble gjennomført ved Faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden februar 2009 til mai 2010.

Veiledere:

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Stipendiat Marte Balchen

Professor Léon Reubsaet

Forord

Jeg vil først få rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for all god veiledning og hjelp under mastergradsarbeidet. Takk for at det aldri er noe problem å spørre deg om råd, og for at du tar så godt vare på studentene dine.

Videre vil jeg takke mine øvrige veiledere Marte Balchen og Léon Reubsæet for gode råd og oppfølging. En særlig takk til deg Marte for at du har holdt ut med alle spørsmålene mine, og for all tiden du har brukt på å hjelpe meg. Det har jeg satt veldig stor pris på!

Malin, Siri, Tam, Quang, Lars Erik, Jon og Knut Fredrik: Takk for hyggelige dager på kontoret og laben. Til slutt vil jeg takke alle ved avdelingen for hjelp når det måtte være, og for et positivt og godt miljø.

Oslo, mai 2010

Anne Guro Hatterud

Innholdsfortegnelse

1. FORKORTELSER.....	6
2. SAMMENDRAG.....	8
3. INTRODUKSJON.....	9
4. TEORI.....	11
5. EKSPERIMENTELT.....	15
5.1 KARAKTERISTIKK AV ANALYSERTE SUBSTANSER.....	15
5.2 UTSTYR, OPPSETT OG FRAMGANGSMÅTE FOR EME.....	15
5.3 LC/MS.....	16
5.4 DIGEST AV CYTOKROM C MED TRYPSIN.....	17
5.5 DIGEST AV BOVINT SERUMALBUMIN (BSA) MED TRYPSIN.....	18
5.6 TILLAGING AV LØSNINGER.....	18
5.7 KJEMIKALIER.....	19
6. RESULTATER OG DISKUSJON.....	21
6.1 DE KJEMISKE EGENSKAPENES INNVIRKNING PÅ EKSTRAKSJONSUTBYTTET.....	21
6.2 ANDRE ORGANISKE FASER.....	26
6.3 SPENNINGENS INNVIRKNING PÅ UTBYTTET.....	28
6.4 EKSTRAKSJONSTIDENS INNVIRKNING PÅ UTBYTTET.....	29
6.5 EFFEKT AV HEPTANSULFONSYRE SOM IONPARDANNER.....	30

6.6 DET ORGANISKE LØSEMIDLETS INNVIRKNING PÅ DEN	
KROMATOGRAPHISKE SEPARASJONEN.....	31
7. KONKLUSJON.....	33
8. KILDELISTE.....	34
9. APPENDIKS.....	37

1. Forkortelser

EME	Elektromembranekstraksjon
LPME	Liquid Phase Micro Extraction (væskefasemikroekstraksjon)
LLE	Liquid Liquid Extraction (væske-væske-ekstraksjon)
SPE	Solid Phase Extraction (fast-fase-ekstraksjon)
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (væskeskromatografi/massespektrometri)
SIM	Selected Ion Monitoring (selektiv ionemonitorering)
m/z	Forholdet mellom masse og ladning
ABC	Ammoniumbikarbonat
BSA	Bovint serumalbumin
CC	Cytokrom c
DTT	Dithiotreitol
IAA	Iodoacetic acid
DEHP	Di- (2-etylheksyl) fosfat
NPOE	Nitrofenyloktyleter
TOPO	Tri- <i>n</i> -oktylfosfinoksid
IBK	Di-isobutylketon
HCOOH	Maursyre
AH	Average hydrophilicity (gjennomsnittlig hydrofilisitet)
pI	Isoelektrisk punkt

Ile	Isoleucin
Pro	Prolin
rpm	Rotasjoner per minutt
mM	Millimolar
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
mg	Milligram
μ g	Mikrogram
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
V	Volt
mA	Milliampere

2. Sammendrag

For å få mer kunnskap om hvilke peptider som kan ekstraheres med elektromembranekstraksjon ved ulike betingelser, ble det gjort ekstraksjonsforsøk med en rekke peptider med forskjellige egenskaper. Det var i alt 37 peptider med gjennomsnittlig hydrofilisitet fra -2,0 til +1,0. Disse framkom ved enzymatisk spalting av cytokrom c og bovint serumalbumin, i tillegg til at det ble brukt rensustanser av enkelte peptider. Analyttene ble ekstrahert fra en vandig, sur donorløsning gjennom en porøs hulfiber innsatt med et organisk løsemiddel som dermed utgjorde en kunstig væskemembran. De ble derfra ekstrahert over i en vandig, sur akseptorløsning. Drivkraften i systemet var den påsatte spenningen. Peptidene var netto positivt ladet i det sure miljøet, og dermed ble den positive elektroden plassert i donorfasen og den negative i akseptorløsningen.

Det ble gjort forsøk med forskjellige organiske faser, og med varierende spenning og ekstraksjonstid. Utbyttene etter 5 minutter ekstrahering var relativt lave. De organiske fasene som ga høyest utbytter var eugenol og 1-oktanol + di-isobutylketon + di- (2-etylheksyl) fosfat. Disse ble undersøkt nærmere. Med eugenol viste det seg at de ikke-polare peptidene med gjennomsnittlig hydrofilisitet under 0,2 ble ekstrahert i størst grad. 1-oktanol + di-isobutylketon + di- (2-etylheksyl) fosfat ekstraherte både polare og ikke-polare peptider. 1-oktanol + 15-crown-5 var også en organisk fase som det ble sett nærmere på, og viste seg å være en væskemembran som var mer selektiv for de ikke-polare peptidene med gjennomsnittlig hydrofilisitet under 0. Det ble også vist at utbyttene økte med økende spenning og ekstraksjonstid opp til et visst punkt, der utbyttene flatet ut. Det ble undersøkt om utbyttet kunne økes ved tilsetning av heptansulfonsyre som ionpardanner i donorløsningen, men det ble ikke observert at dette hadde innvirkning på hvor mye som ble ekstrahert.

Ved å endre sammensetningen av væskemembranen ble det altså vist at man kan oppnå noe selektivitet. Mer forskning trengs imidlertid for å få økt kunnskap om de kjemiske egenskapenes innvirkning på utbyttet.

3. Introduksjon

Innenfor farmasøytisk bioanalyse er prøveopparbeidelsen en viktig del av den analytiske prosedyren. Før en biologisk prøve, for eksempel en blod- eller urinprøve, kan analyseres kvantitativt eller kvalitativt, er det som regel nødvendig med en isolering og oppkonsentrering av analytten som skal bestemmes. Det finnes forskjellige teknikker for dette. Væske-væske-ekstraksjon (LLE) er en veletablert metode som er basert på hvordan en analytt fordeler seg mellom en vandig fase og en organisk fase. En annen mye brukt teknikk er fast-fase-ekstraksjon (SPE), der analytten vil fordele seg mellom en væske og overflaten av et fast stoff. Dersom man har en proteinholdig matriks, for eksempel plasma, kan proteinfelling være en aktuell prøveopparbeidelsesmetode. Da tilsettes prøven et fellingsreagens som gjør at proteinene feller ut. (1)

I de senere årene er også andre teknikker lansert, da de klassiske metodene har enkelte bakdeler. Ulemper med væske-væske-ekstraksjon er for eksempel høyt forbruk av organisk løsemiddel, vanskeligheter med automatisering, stort tidsforbruk og anvendelse av løsemidler som kan være miljøskadelige. Som et alternativ til LLE ble LPME (væskefasemikroekstraksjon) introdusert. LPME kan være et tofase- eller trefasesystem, og er som LLE basert på passiv diffusjon. Et trefasesystem består av en vandig donorløsning, en hulfiber som er innsatt med et organisk løsemiddel og en vandig akseptorløsning som fylles i fiberen. Hulfiberen dyppes i det organiske løsemidlet som dermed blir immobilisert i fiberens vegg og danner en kunstig væskemembran. Fiberen plasseres i donorløsningen der analyttene befinner seg. Dersom analyttene er basiske, benyttes en basisk donorløsning og en sur akseptorløsning. Stoffene vil da vandre gjennom den organiske væskemembranen og over i akseptorfasen der de er ioniserte og har høyere løselighet. Volumer er typisk 1-4 mL donorløsning og 15-20 µL akseptorløsning. I tofasesystemet har man en vandig donorløsning og en porøs hulfiber som er fylt med et organisk løsemiddel. Den organiske fasen befinner seg da både i fiberens vegg og hulrom. pH i donorløsningen justeres avhengig av om analyttene er sure eller basiske, og hulfiberen plasseres ned i donorfasen. Stoffene vil da gå over i den organiske fasen der løseligheten er høyere. (2-5)

For få år siden ble en annen teknikk utviklet; mikroekstraksjon over en væskemembran ved hjelp av strøm, kalt elektromembranekstraksjon (EME). Dette er en teknikk som har mange likheter med LPME. Analyttene i donorløsningen går også her gjennom den organiske fasen

og over i akseptorløsningen. Drivkraften i dette systemet er imidlertid spenningen som pålegges, som gjør at ioniserte stoffer vandrer mot elektroden i akseptorfasen med motsatt ladning. Dette er vist å være en rask teknikk som gir svært rene ekstrakter, og forbruket av organisk løsemiddel er minimalt. Det er også mulighet for god oppkonsentrering. Mens tidsforbruket ved LPME kan være opptil 60 minutter, er det vist at de samme utbyttene kan oppnås etter kun fem til ti minutter med EME. Hittil er det demonstrert at både basiske og sure stoffer kan ekstraheres med EME og gi høye utbytter. Det er også gjort forsøk med biologiske prøver som plasma og urin, som har gitt lovende resultater. (6-10)

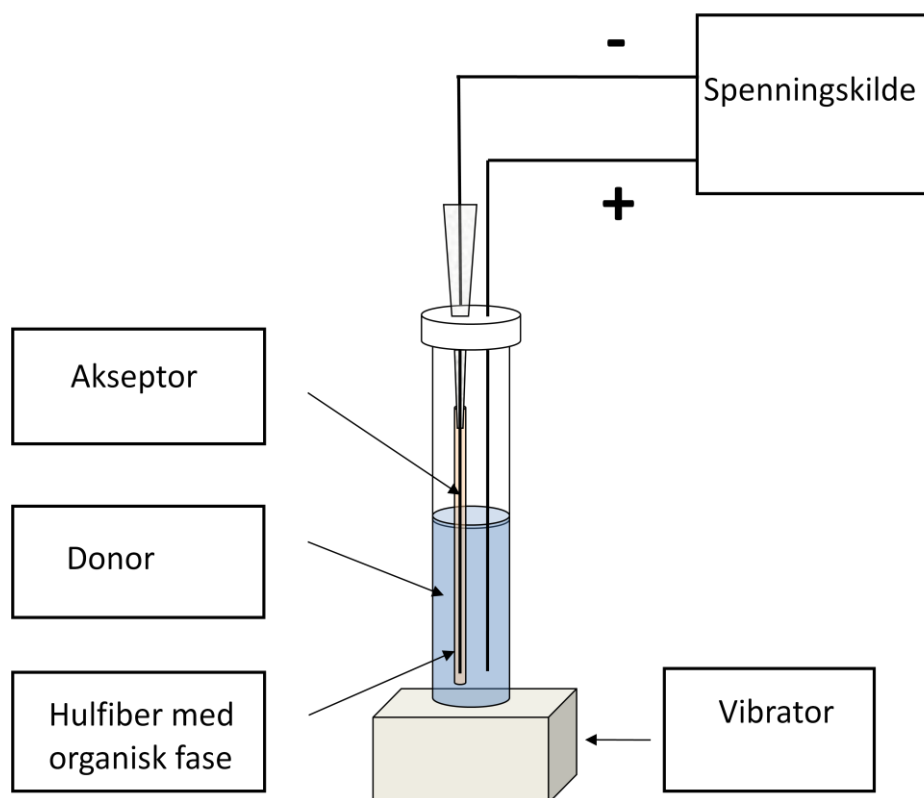
Nylig ble det vist at også peptider kan ekstraheres med elektromembranekstraksjon. Peptider kan for eksempel være legemidler, hormoner, nevrotransmittere og biomarkører, og er stoffer det kan være ønskelig å påvise og bestemme konsentrasjonen av i en biologisk prøve. Tradisjonelle prøveoppbevaringsmetoder for peptider er blant annet væske-væske-ekstraksjon, fast-fase-ekstraksjon, sentrifugering, utfelling, dialyse og ultrafiltrering. Disse er til dels tidkrevende og uspesifikke, slik at det er et behov for en raskere og mer spesifikk metode. I den forbindelse kan EME bli en viktig fremtidig prøveoppbevaringsmetode for peptider. (11-14)

Arbeidet som er gjort til nå har vist at peptider kan ekstraheres fra vandige prøver i varierende grad. Faktorer man har sett påvirker utbyttet er peptidenes struktur og størrelse, organisk fase, spenning, tid og pH i donor- og akseptorfasen. Enkelte peptider har blitt ekstrahert med relativt høye utbytter. Det er også gjort forsøk med ekstraksjon fra humant plasma. Tre angiotensinpeptider ble på ti minutter ekstrahert med utbytter mellom 25 og 43 %. Resultatene har vært lovende, men de begrenser seg til noen få relativt små og hydrofobe peptider. (11, 15)

For bedre å forstå mulighetene og begrensningene med denne teknikken, trengs det data på flere stoffer. Målet med denne oppgaven har vært å undersøke mer om hva slags peptider som kan ekstraheres under bestemte betingelser. Det er ønskelig i større grad å kunne forutsi dette ut fra peptidenes kjemiske egenskaper og struktur. Det vil gjøre at man får mer kunnskap om hvordan ekstraksjonsbetingelsene kan endres for å ekstrahere bestemte peptider med større grad av selektivitet. For å generere en rekke peptider med ulike egenskaper ble det gjort enzymatisk klipp av proteinene cytochrom c og bovint serumalbumin, i tillegg til at det ble brukt blandinger av forskjellige enkeltpeptider. Disse blandningene ble sammen med de spaltede proteinene benyttet som donorløsninger.

4. Teori

Elektromembranekstraksjon (EME) er en ny metode for prøveopparbeidelse som baserer seg på elektrokinetisk migrasjon av ioniserte analytter over en kunstig væskemembran. Analyttene i donorløsningen ekstraheres over i en akseptorfase gjennom væskemembranen som skiller de to fasene. Det er en mikroekstraksjonsteknikk som gir et svært lavt forbruk av organisk løsemiddel, og som raskt kan gi en god oppkonsentrering av ioniserte substanser.



Figur 4.1: Ekstraksjonsoppsettet for EME

Figur 4.1 viser oppsettet for EME. Man har en vandig donorløsning i et prøveglass, gjerne i størrelsesorden 500 μL . pH i denne løsningen justeres slik at stoffene er ioniserte, dvs. at for basiske stoffer benyttes en sur donorløsning. En porøs hulfiber dyppes i et organisk løsemiddel slik at det dannes en kunstig væskemembran i hulfiberens vegg. Fiberen plasseres i donorløsningen gjennom et hull i lokket. En vandig akseptorløsning fylles i hulrommet i fiberen, og denne løsningen må også være pH-justert slik at analyttene er ioniserte. En platinaelektrode plasseres i donorfasen, og en annen i akseptorfasen. Disse er begge koblet til en spenningskilde.

I dette trefasesystemet er det spenningen som pålegges over membranen som driver ekstraksjonen. De ioniserte analyttene i donorløsningen trekkes mot elektroden med motsatt ladning i akseptorløsningen. I denne oppgaven var analyttene peptider. Det er zwitterioniske stoffer som kan ha både positiv og negativ ladning. Det ble valgt å ha peptidene netto positivt ladet, slik at den negative elektroden ble plassert i akseptorfasen og den positive i donorfasen.

For å oppnå elektrokinetisk migrasjon er det avgjørende at hele systemet fungerer som en elektrisk krets. Dette omfatter både donorfase, organisk fase og akseptorfase. Det mest kritiske blir evnen den organiske fasen har til å lede strøm, siden donor- og akseptorfase er vandige løsninger. Imidlertid vil følgende elektrodereaksjoner skje:

Negativ elektrode: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Positiv elektrode: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^-$

Disse reaksjonene fører til at det dannes oksygen- og hydrogengass ved elektrodene, noe som gir bobledannelse. Dette skjer i økende grad med økende strømføring gjennom membranen. I akseptorfasen vil det kunne skje en økning i pH siden det forbrukes H^+ , mens pH i donorløsningen vil kunne gå ned fordi H^+ genereres. Dette er ikke ønskelig, siden det gir endrede betingelser underveis i ekstraksjonsprosessen. (6, 7)

Matematisk kan fluksen J_i av en ionisk substans i gjennom en væskemembran under tilstedeværelse av et pålagt elektrisk felt beskrives av den modifiserte Nernst-Planck-ligningen:

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi}\right) \left(\frac{\chi-1}{\chi-\exp(-v)}\right) (c_i - c_{i0} \exp(-v)) \quad (1)$$

der D_i er diffusjonskoeffisienten for analytten, h er tykkelsen på væskemembranen, χ er forholdet mellom ionekonsentrasjonen i donorløsningen og ionekonsentrasjonen i akseptorløsningen (ionebalansen), c_i er konsentrasjonen i grenseflaten mellom donorfasen og membranen, c_{i0} er konsentrasjonen i grenseflaten mellom membranen og akseptorfasen, og v er den dimensjonsløse dragstyrken i systemet. v er definert ved ligning (2):

$$v = \frac{z_i e \Delta \Phi}{kT} \quad (2)$$

der z_i er analyttens ladning, e er den elementære ladningen, $\Delta\Phi$ er den elektriske spenningsforskjellen over væskemembranen, k er Boltzmanns konstant og T er den absolutte temperaturen. Diffusjonskoeffisienten er et mål på diffusjonshastighet, og er avhengig av type substans og type væskemembran (16). Tykkelsen på membranen har også innvirkning på analyttens migrasjon. Jo tynnere membran, jo høyere blir fluksen av analytt. Migrasjonen kan også økes ved å senke ionebalansen. Dette kan gjøres ved å øke ionekonsentrasjonen i akseptorløsningen sammenlignet med donorløsningen, dvs. å ha en akseptorfase som er surere enn donorfasen dersom det skal ekstraheres basiske stoffer. Ionebalansen kan også senkes på andre måter, for eksempel ved å tilsette natriumklorid til akseptorløsningen. Ved å øke temperaturen vil i tillegg fluksen gjennom membranen øke. Det samme skjer dersom spenningsforskjellen over væskemembranen økes. (17)

Den organiske fasen har mye å si for hvilke stoffer som kan ekstraheres. Det er viktig at fordelingen inn i væskemembranen er høy nok. Forsøk har for eksempel vist at NPOE er et løsemiddel som er godt egnet til å ekstrahere relativt hydrofobe basiske stoffer (18). Analytter med lave log P-verdier vil ha dårligere løselighet i denne fasen og dermed ekstraheres i mindre grad. Det samme gjelder for stoffer med stor grad av ladning og stoffer med et høyt antall heteroatomer. NPOE er også vist å være en lite egnet organisk fase for å ekstrahere sure stoffer. For sistnevnte gruppe ble det funnet at langkjedede alkoholer som fungerte som sterke protonakseptorer var det mest optimale. (7, 18)

For å øke ekstraksjonutbyttene av de mer hydrofile stoffene, kan væskemembranen endres i form av å tilsette en ionpardanner. Et eksempel på denne typen stoff er DEHP, som i forsøk har vist å gi høyere utbytter av polare basiske stoffer, samtidig som de hydrofobe substansene har blitt ekstrahert i mindre grad (8). DEHP vil orientere seg i grenseflaten mellom donorfase og organisk fase. Det har en hydrofob del som vil befinne seg i den organiske fasen, og en negativt ladet del som orienterer seg mot den vandige fasen. Her vil DEHP-molekylene kunne danne hydrofobe ionpar med de positivt ladde analyttene i donorløsningen, og dermed gi økt løselighet av analytt i organisk fase. Ved grenseflaten til akseptorfasen vil analyttene bli frigitt og DEHP bli protonert. Dette betinger imidlertid at pH i akseptorløsningen er lav nok til at DEHP kan ta opp et proton, siden $pK_a \approx 1,5$. Med andre ord vil den organiske fasen ha stor innvirkning på hvilke stoffer som går over i akseptorfasen. Stoffer med forskjellige egenskaper vil ekstraheres i ulik grad av sammensetningen av væskemembranen. (8, 11)

Andre parametre som påvirker ekstraksjonen er pH i akseptor- og donorfase, ekstraksjonstid, spenningsstyrke og vibrasjonshastighet. pH må justeres slik at analyttene er på ionisert form og dermed vil vandre mot den motsatt ladede elektroden. Utbyttene er vist å øke med økende ekstraksjonstid opp til et visst nivå, hvor de deretter ser ut til å stabilisere seg. Noe av den samme tendensen er sett med økende pålagt spenning, men her later det til at det er større variasjoner mellom de ulike stoffene. Vibrasjonshastigheten har også innvirkning på utbyttet. Å ekstrahere uten vibrering har vist å gi svært lave utbytter. Det er observert en økning i utbyttene med økende vibrasjonshastighet, før de har avtatt etter et visst punkt. Det er altså mange faktorer som spiller inn og som må tas hensyn til for at ekstraksjonen skal bli optimal. (6, 7, 9)

Elektromembranekstraksjon av peptider gir noe mer komplekse stoffer å jobbe med. Peptidene består av ulike aminosyrer, og har en karboksylsyregruppe i den ene enden og en aminogruppe i den andre. Aminosyrene har sidegrupper med ulike egenskaper som kan være sure, basiske, nøytrale, hydrofobe og hydrofile. De vil dermed kunne ha både positiv og negativ ladning, samt flere ioniserbare grupper. Peptider kan altså være svært forskjellige både med hensyn til størrelse og kjemiske egenskaper. I de forsøkene som er gjort med elektromembranekstraksjon av peptider ble det vist at alkoholer var de beste organiske fasene, for eksempel oktanol (11). Tilsetning av en ionpardanner som DEHP til væskemembranen viste seg å være av betydning for å få høye utbytter. Det er også viktig å ta hensyn til pH i donor- og akseptorfase. Dersom det velges å la peptidene være på netto positivt ladet form, må ikke pH bli for høy slik at graden av negativ ladning blir for stor. Det er viktig for at peptidene skal trekkes mot den negative elektroden i akseptorfase, i tillegg til å kunne danne ionpar med for eksempel DEHP. En har også sett at spenningen som pålegges ikke bør være for høy for å oppnå høyest mulig utbytter. Som for tidligere forsøk med sure og basiske legemidler er det observert en økning i utbyttene som funksjon av tid, med en utflatning etter ca ti minutter. Utbyttene har imidlertid variert betydelig avhengig av kjemiske egenskaper ved peptidene, aminosyresekvens og antall aminosyrer, der det er de mest hydrofobe peptidene som har gitt høyest utbytter med oktanol og DEHP som organisk fase. Peptidene later til å være stabile under ekstraksjon ut fra de eksperimentene som er utført. (11, 15, 19)

5. Eksperimentelt

5.1 Karakteristikk av analyserte substanser

Det ble til sammen inkludert 37 ulike peptider i forsøkene. En oversikt over disse er vist i tabell i appendiks.

5.2 Utstyr, oppsett og framgangsmåte for EME

Utstyr og oppsett

Oppsettet for EME er vist i figur 4.1. Den porøse hulfiberen som ble innsatt med et organisk løsemiddel var en PP Q3/2 hulfiber av polypropylen (Membrana, Wuppertal, Tyskland), med en indre diameter på 1,2 mm, veggtykkelse på 200 μm og porestørrelse på 0,2 μm . Denne ble festet til en pipettespiss av polypropylen (Finntip 200 Ext, Thermo Electron, Vantaa, Finland). Donorløsningen ble fylt i en Brand Snap-Cap beholder av polyetylen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland), med et volum på 0,8 mL, indre diameter på 6 mm og høyde på 31 mm. I donor- og akseptorløsningene ble det plassert platinatråder med en diameter på 0,5 mm (K. Rasmussen, Hamar, Norge). Disse fungerte som elektroder. Spenningskilden som ble brukt var en ES 0300-0,45-modell fra Delta Power Supplies (Delta Elektronika, Zierikzee, Nederland), hvor spenningen kunne varieres fra 0 til 300 V, og med en maksimal strømstyrke på 450 mA. Ekstraksjonsenheten ble ristet med en Vibramax 100 vibrator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) under ekstraksjonen.

Fremgangsmåte

500 μL donorløsning ble pipettert opp i et prøveglass. Hulfiberen ble klippet opp i biter på 2,4 cm. Hver bit ble festet til en 2,1 cm lang pipettespiss av polypropylen, og lukket i den nedre enden ved mekanisk trykk. Polypropylenfiberen ble deretter dyppet i et organisk løsemiddel i fem sekunder, og overskudd løsemiddel ble tørket av med papir. Dermed ble det dannet en kunstig væskemembran. Hulrommet i polypropylenfiberen ble ved hjelp av en mikrosprøyte fylt med 25 μL 100 mM maursyre, som fungerte som akseptorløsning. Hulfiberen ble så plassert ned i prøveglasset med donorløsning gjennom et hull i lokket. Den negative elektroden ble plassert i akseptorløsningen, mens den positive ble plassert i donorløsningen gjennom et lite hull i lokket. Elektrodene ble deretter koblet til spenningskilden. For å oppnå elektrokinetisk migrasjon ble spenningen satt til 25 V, mens

ekstraksjonsenheten ble vibrert ved 900 rpm. Ekstraksjonstiden var 5 minutter. Spenningen ble slått av og vibreringen stoppet etter endt ekstraksjonstid, og 20 µL akseptorfase ble pipettert ut fra fiberen ved hjelp av en tynn pipettespiss festet til en mikropipette (Microloader, 0,5-20 µL, Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland). Akseptorfasen ble deretter analysert direkte ved hjelp av LC/MS.

5.3 LC/MS

Singelkvadрупol

Ekstraktene ble analysert med et LCMS-2010A singelkvadрупolinstrument (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separasjonskolonnen var en 50 mm BioBasic-C8-kolonne med indre diameter 1 mm og 5 µm partikkelstørrelse (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Autoinjektoren var en SIL-10ADvp-modell, pumpene LC-10ADvp-modeller og degasseren var en DGU-14A-modell (alle Shimadzu, Kyoto, Japan).

Mobilfase A besto av 20 mM maursyre og metanol (95:5, v/v). Mobilfase B besto av 20 mM maursyre og metanol (5:95, v/v).

I analysene ble det benyttet to ulike gradientelueringer:

1) For ekstraktene fra trypsinert cytokrom c ble konsentrasjonen av mobilfase B økt jevnt til 75 % i løpet av de første 20 minuttene, og sammensetningen deretter holdt konstant i ett minutt. I løpet av det neste minuttet ble sammensetningen endret til 100 % mobilfase A, og kolonnen ble reekvilibrert i 10 minutter. Væskeshastigheten var 50 µL/min de første 23 minuttene, deretter ble den økt til 100 µL/min i løpet av 0,1 minutt og holdt på samme nivå i 8,7 minutter. Hastigheten ble så redusert til 50 µL/min i løpet av 0,2 minutter. Samme gradient ble benyttet for peptidblanding 2 og 3 i forsøkene med enkeltpeptider.

2) For peptidblanding 1 ble konsentrasjonen av mobilfase B økt jevnt til 50 % i løpet av 13 minutter, før isokratisk eluering i 2 minutter. Deretter økte mobilfase B-konsentrasjonen til 75 % i løpet av de neste 5 minuttene, og ble holdt på dette nivået i ett minutt. I løpet av det neste minuttet ble sammensetningen endret til 100 % mobilfase A, før reekvilibrering i 10 minutter. Væskeshastighetene var de samme som for den andre gradienten.

Det ble benyttet elektroprayonisasjon i positiv mode, og analysene ble utført ved hjelp av selektiv ionemonitorering (SIM). For hvert peptid ble det brukt den m/z -verdien som ga

høyest signal til å beregne utbytte. Tørke- og forstøvergass var nitrogen, som ble brukt henholdsvis i mengdene 10-20 L/min og 1,5 L/min. Kapillærtemperaturen og blokktemperaturen var 200 °C, og spenningen over proben var 4,5 kV. Injeksjonsvolumene var 15 µL for alle forsøk.

Orbitrap

For LC-MS/MS-analyse ble prøvene analysert med LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Det ble benyttet en 50 mm BioBasic-C8-kolonne med indre diameter 1 mm og 5 µm partikkelstørrelse (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pumpene var UltiMate 3000-modeller og autoinjektoren UltiMate 3000 RS-modell (alle Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Mobilfase A var 20 mM maursyre og metanol (95:5, v/v). Mobilfase B var 20 mM maursyre og metanol (5:95, v/v).

Mobilfasesammensetningen ble endret fra 100 % A til 75 % B i løpet av de første 30 minuttene, og holdt på dette nivået i 2 minutter. Deretter ble den økt til 100 % B på 0,5 minutter og holdt uendret i 2 minutter. I løpet av et halvt minutt ble konsentrasjonen så endret til 100 % A, før reekvilibrering i 15 minutter. Væskehastigheten var 50 µL/min de første 35 minuttene, deretter 100 µL/min i 14 minutter før den ble redusert til 50 µL/min i løpet av ett minutt.

Ioniseringsteknikken var elektrospayionisasjon i positiv mode. I ionefellen ble det scannet i m/z -området 300-900, og stoffene ble fragmentert. Ionene ble ført inn i selve orbitrap'en slik at signalene kunne detekteres og MS/MS-spektra bli tatt opp. Kapillærtemperaturen var 275 °C, mens kapillærspenningen var 32 V. Spenningen over proben var 5 kV. Nitrogen ble benyttet som tørke- og forstøvergass. For alle prøver ble det injisert 15 µL.

5.4 Digest av cytokrom c med trypsin

50 mM ABC-buffer ble lagd ved å løse 40 mg ammoniumbikarbonat i 10 mL ionebyttet vann. Ferdiglaget cytokrom c-løsning med konsentrasjon 2 mg/mL ble fortynnet til 100 µg/mL med ABC-buffer. Trypsin (~1 mg) ble veid ut og løst i buffer slik at konsentrasjonen ble 1 µg/µL. 2 µL av denne løsningen ble tilsatt 400 µL av den fortynnede cytokrom c-

løsningen, og satt i varmeskap ved 37 °C i ca ett døgn. Deretter ble løsningen porsjonert ut og nedfryst.

5.5 Digest av bovint serumalbumin (BSA) med trypsin

50 mM ABC-buffer ble lagd ved å løse 40 mg ammoniumbikarbonat i 10 mL ionebyttet vann. Stammløsning av BSA med konsentrasjon 2 mg/mL ble lagd ved å løse 2 mg BSA i 1 mL ionebyttet vann, og denne ble fortynnet med ABC-buffer til 200 µg/mL. Volumet på løsningen var 200 µL. Som reduseringsreagens ble det brukt DTT (dithiotreitol). 50 mM DTT-løsning ble lagd ved å løse 7,7 mg DTT i 1 mL ABC-buffer. Denne ble fortynnet til 1 mM, og 6 µL ble tilsatt den fortynnede BSA-løsningen. Prøven stod deretter i 15 minutter ved 95 °C med risting ved 800 rpm, før den ble avkjølt. IAA (iodoacetic acid) ble benyttet som alkyliseringsreagens. 50 mM IAA-løsning ble lagd ved å løse 9,3 mg i 1 mL buffer. Denne ble fortynnet til 5 mM, og 5 µL ble tilsatt BSA-løsningen. Deretter stod prøven mørkt ved romtemperatur i 15 minutter. Trypsin(~ 1 mg) ble veid ut og løst i buffer slik at konsentrasjonen ble 1 mg/mL, og 1 µL ble tilsatt BSA-løsningen. Prøven stod i varmeskap ved 37 °C i ca ett døgn, og ble deretter fryst ned.

5.6 Tillaging av løsninger

Standard-/donorløsning

Standardløsningen i de innledende forsøkene ble lagd ved å fortynne trypsinert cytokrom c-løsning med konsentrasjon 100 µg/mL. Løsningen ble fortynnet med 10 mM maursyre til typisk 10 µg/mL. I forsøkene der det ble brukt enkeltpeptider ble stoffene delt i tre blandinger. Stammløsninger av endomorfin og enkefalin med konsentrasjoner 1 mg/mL ble lagd ved å løse 1 mg peptid i 1 mL ionebyttet vann. For de øvrige peptidene ble det benyttet ferdiglagde stammløsninger med konsentrasjoner fra 100 µg/mL til 1 mg/mL. Det ble lagd tre fortynnede blandinger av stoffene i vann, med konsentrasjon 10 µg/mL av hvert peptid, se tabell 5.1. Løsningene ble nedfryst porsjonsvis. På analysedagen ble de fortynnet med 10 mM maursyre til konsentrasjon 100 ng/mL. En siste standardløsning ble lagd ved å fortynne trypsinert BSA-løsning med konsentrasjon 200 µg/mL. Denne ble fortynnet til 10 µg/mL med 10 mM maursyre. I forsøkene ble standardløsningene også brukt som donorløsninger, se tabell 5.2.

Tabell 5.1: Blandinger med enkeltpeptider

Blanding 1	Blanding 2	Blanding 3
Angiotensin 1	Angiotensin 2	Angiotensin 3
Angiotensin 2 antipeptid	Neurotensin 1-6	Neurotensin 1-8
Endomorfin	Bradykinin	Vasopressin
Enkefalin		Ile-pro-ile

Tabell 5.2: Ulike donor- og standardløsninger

Donor/standard 1	Trypsinert cytokrom c
Donor/standard 2	Peptidblanding 1
Donor/standard 3	Peptidblanding 2
Donor/standard 4	Peptidblanding 3
Donor/standard 5	Trypsinert BSA

Maursyreløsninger

100 mM maursyre ble lagd ved å tilsette 377 μL HCOOH til ionebyttet vann til et samlet volum på 100 mL. 10 mM maursyre ble lagd ved å tilsette 10 mL 100 mM maursyre til ionebyttet vann og fylle opp målekolben med vann til 100 mL.

Heptansulfonsyreløsning

500 mM heptansulfonsyre ble lagd ved å løse 1,13 g sulfonsyre i ionebyttet vann til et totalt volum på 10 mL.

Mobilfaser

20 mM maursyre ble lagd ved å tilsette 755 μL HCOOH til ionebyttet vann til samlet volum 1,0 L.

Mobilfase A besto av 25 mL metanol og 475 mL 20 mM maursyre.

Mobilfase B besto av 25 mL 20 mM maursyre og 475 mL metanol.

5.7 Kjemikalier

Cytokrom c, trypsin, angiotensin 2 antipeptid, neurotensin 1-6, neurotensin 1-8, endomorfin, bradykinin, substans P, vasopressin, ile-pro-ile, 1-oktanol, eugenol, di- (2-etylheksyl) fosfat (DEHP), di-isobutylketon (IBK) og iodoacetic acid (IAA) var fra Sigma-Aldrich (Oslo,

Norge). Angiotensin 1, angiotensin 2 og enkefalin var fra Bachem (Bubendorf, Sveits). Angiotensin 3, nitrofenyloktyleter (NPOE), heptansulfonsyre, tri-*n*-oktylfosfinoksid (TOPO), kroneter (15-crown-5), ammoniumbikarbonat og dithiotreitol (DTT) var fra Fluka (Buchs, Sveits). Maursyre var fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Metanol var fra VWR International (Leuven, Belgia).

6. Resultater og diskusjon

6.1 De kjemiske egenskapenes innvirkning på ekstraksjonsutbyttet

Målet har vært å undersøke om det er sammenhenger mellom peptidenes kjemiske egenskaper og hvordan de ekstraheres ved bestemte betingelser. Peptider ble framskaffet ved enzymatisk å spalte cytokrom c og bovint serumalbumin med trypsin som beskrevet i avsnittene 5.4 og 5.5. I tillegg ble det benyttet peptider som forelå som rensesubstanser, se tabell 5.1. Til sammen utgjorde dette 37 ulike peptider med forskjellige kjemiske egenskaper, strukturer og størrelser som vist i tabell i appendiks. De bestod av mellom 3 og 16 aminosyrer, hadde pI-verdier fra 3,7 til 12,4 og AH-verdier (gjennomsnittlig hydrofilisitet) mellom -2,0 og +1,0. Jo mer polare peptidene var, jo høyere AH-verdier hadde de.

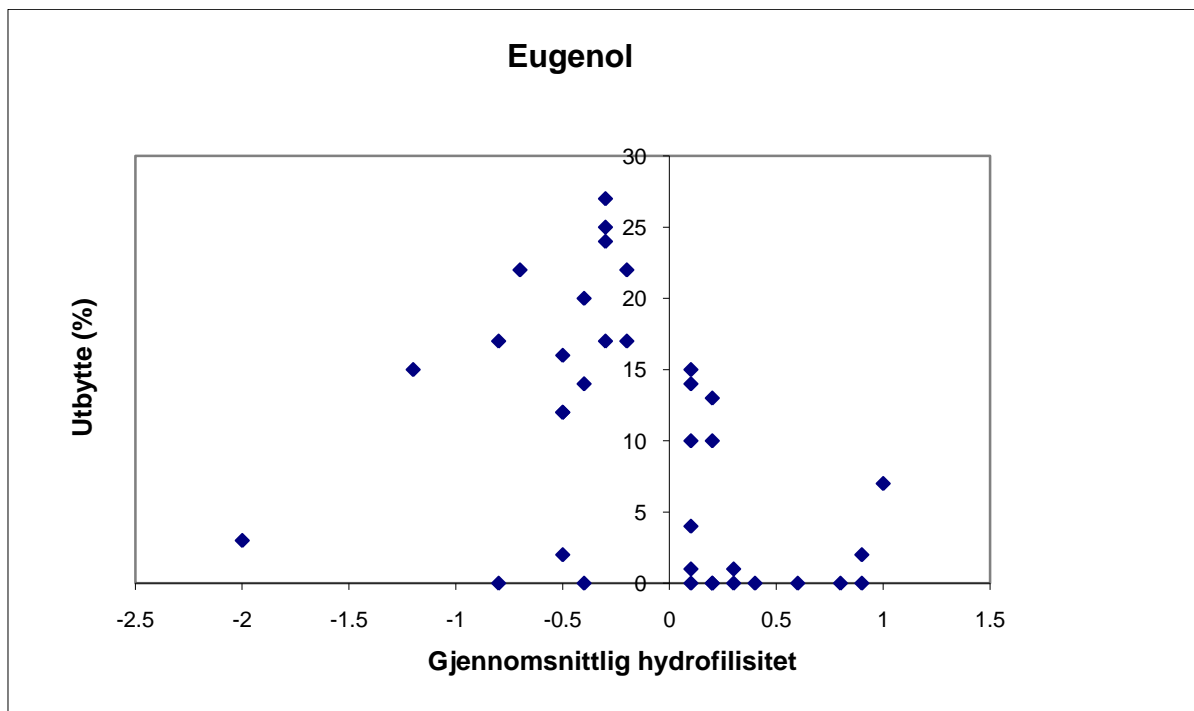
På bakgrunn av resultatene fra ekstraksjonsforsøk med ulike organiske faser, beskrevet i avsnitt 6.2, ble det valgt å benytte følgende tre faser:

1. Eugenol (4-allyl-2-metoksyfenol)
2. 55 % (w/w) 1-oktanol + 35 % (w/w) di-isobutylketon + 10 % (w/w) di- (2-etylheksyl) fosfat (DEHP)
3. 95 % (w/w) 1-oktanol + 5 % (w/w) 15-crown-5

Ekstraksjonstiden var 15 minutter og spenningen var 25 V. I donorløsningen ble det benyttet 10 mM HCOOH (pH ~ 2,9), og akseptorløsningen var 100 mM HCOOH (pH ~ 2,4). Hele ekstraksjonsenheten ble ristet ved 900 rpm. Både akseptor- og donorløsningen ble analysert etter ekstraksjon ved hjelp av LC-MS/MS (orbitrap). Dette muliggjorde å sette opp en massebalanse der mengden peptider som befant seg i den organiske fasen etter ekstraksjon kunne estimeres, se tabell 6.1.

Dette var første gang eugenol ble prøvd ut innenfor elektromembranekstraksjon. Eugenol har en log P-verdi på 2,55 (20). Det viste seg å være de hydrofobe peptidene som ble ekstrahert i størst grad med denne væskemembranen. Dette er vist i figur 6.1. 23 av de 28 peptidene med AH-verdi under 0,2 ble ekstrahert med eugenol, dvs. 82 % av disse peptidene. I denne gruppen var det fem peptider som ikke lot seg ekstrahere. Dette gjaldt BSA6, BSA14, CC5,

BSA7 og BSA15. Ut fra massebalansen kan det sees at BSA6 fortsatt befant seg i donorløsningen etter ekstraksjon. Årsaken til dette kunne være at nettoladningen ved pH 2,9 var nær 0, noe som vanskeliggjorde elektrokinetisk migrasjon. Det later til at en del av peptidet BSA14 hadde blitt ekstrahert inn i væskemembranen, uten å ha migrert over i akseptorløsningen. Årsaken til dette var uklar. Peptidene CC5, BSA7 og BSA15 befant seg i hovedsak i donorfasen. Grunnen til dette kunne ikke fastslås, men alle disse peptidene bestod av 15 eller 16 aminosyrer. Det kunne dermed tyde på at store peptider var vanskeligere å ekstrahere. Det mest hydrofobe peptidet var endomorfine med en AH-verdi på 2,0. Det ble ekstrahert med et utbytte på kun 3 %. 88 % befant seg imidlertid i væskemembranen, noe som kunne bety at veldig hydrofobe peptider utviste høy grad av fordeling inn i den organiske fasen og gjorde de vanskelige å ekstrahere med eugenol.



Figur 6.1: Ekstraksjonsutbytte som funksjon av gjennomsnittlig hydrofilisitet med eugenol som organisk fase. Enkelte peptider har samme AH-verdi og utbytte, og vises dermed som ett punkt i figuren.

For de mer polare peptidene med AH-verdier over 0,2 var det kun 38 % som lot seg ekstrahere med eugenol. Det indikerte at denne fasen var mindre egnet til å ekstrahere polare peptider. Dette kan illustreres med peptidene BSA2 (AH-verdi = 0,6) og neurotensin 1-6 (AH-verdi = 0,9). Etter ekstraksjon var henholdsvis 96 % og 86 % igjen i donorløsningen.

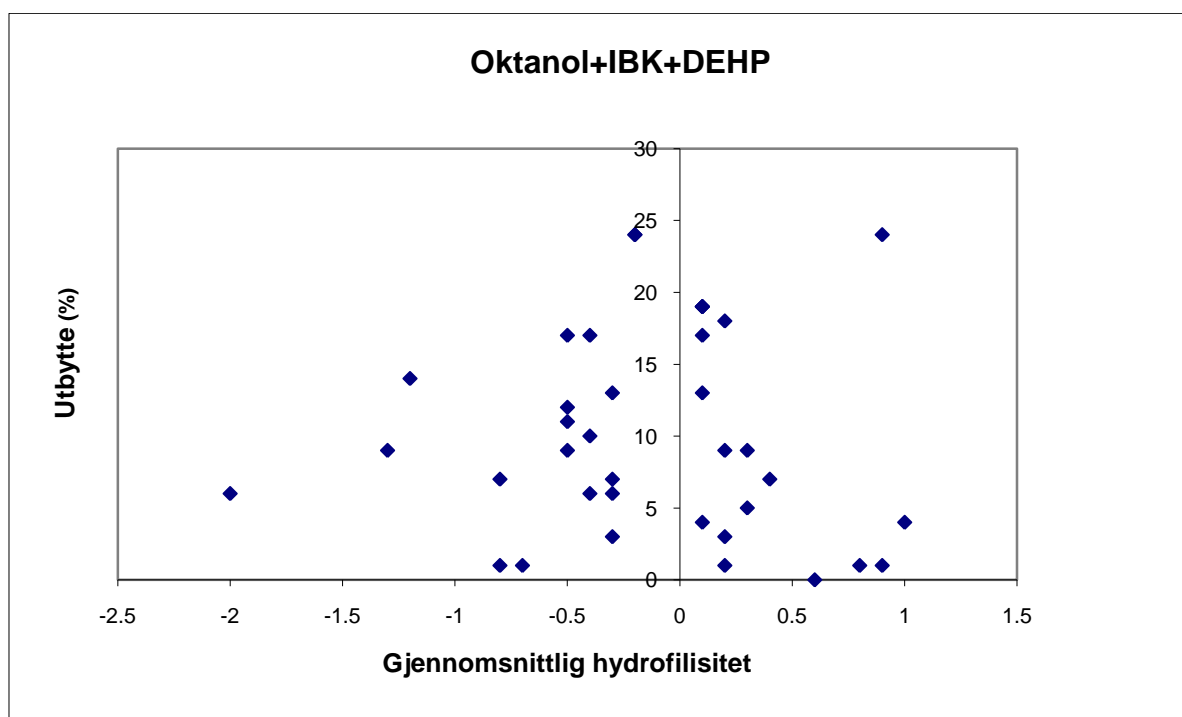
Det tydet dermed på at de hadde dårlig løselighet i den organiske fasen på grunn av polariteten og derfor ble ekstrahert i liten grad fra donorfasen.

Det gjennomsnittlige ekstraksjonsutbyttet med eugenol for de 28 peptidene med AH-verdier mellom -2,0 og 0,2 var 12 %, som vist i tabell 6.1. Dette var relativt lavt, men kan skyldes at betingelsene som ble brukt ikke var de mest optimale. Det ville sannsynligvis vært mer gunstig med lavere pH i akseptorløsningen, siden det vil skje elektrolyse. Da øker pH i akseptorfasen, mens pH i donorløsningen går ned og pH-forskjellen mellom de to fasene blir mindre. Det ble imidlertid valgt å bruke maursyre for å gi kompatibilitet med MS-instrumentet, siden det var en flyktig væske og ekstraktene kunne injiseres direkte uten fortynning.

Siden eugenol var et rent organisk løsemiddel, var ekstrahering inn i denne væskemembranen hovedsakelig basert på løsemiddelinteraksjoner. For de 28 peptidene med AH-verdi lavere enn 0,2 var gjennomsnittlig 66 % av peptidmengden gjenværende i donorløsningen. Dette tyder på at peptidene ikke hadde så høy affinitet for eugenol og at det ble en begrensende faktor for graden av ekstraksjon. Mengden som befant seg i væskemembranen etter endt ekstraksjon var i gjennomsnitt 22 %. Eugenol viste seg altså å være selektiv overfor de hydrofobe peptidene med AH-verdier mellom -2,0 og 0,2.

Med væskemembran nr. 2, 1-oktanol + di-isobutylketon + DEHP, ble både de polare og ikke-polare peptidene ekstrahert. Dette er illustrert i figur 6.2. 97 % av peptidene lot seg ekstrahere, uavhengig av AH-verdi. Utbyttene var i gjennomsnitt 10,4 % for de 19 peptidene med negative AH-verdier. For de polare peptidene med positive AH-verdier var gjennomsnittet 9,6 %. Med andre ord hadde ikke AH-verdien innvirkning på utbyttet. Peptidet BSA2 var det eneste som ikke ble ekstrahert med denne væskemembranen. Massebalansen viste at det var tilnærmet likt fordelt mellom donorløsningen og den organiske fasen. Årsaken til dette var imidlertid ukjent. For de 37 peptidene i sin helhet var gjennomsnittlig utbytte 10 %, noe som var sammenlignbart med eugenol. Med væskemembran nr. 2 var derimot 60 % av peptidmengden i organisk fase etter ekstraksjon, og 30 % befant seg i donorfasen. Dette viser at peptidene i stor grad ble ekstrahert ut fra donorfasen og inn i væskemembranen. Videre ekstraksjon over i akseptorfasen viste seg vanskeligere på grunn av den høye affiniteten for organisk fase.

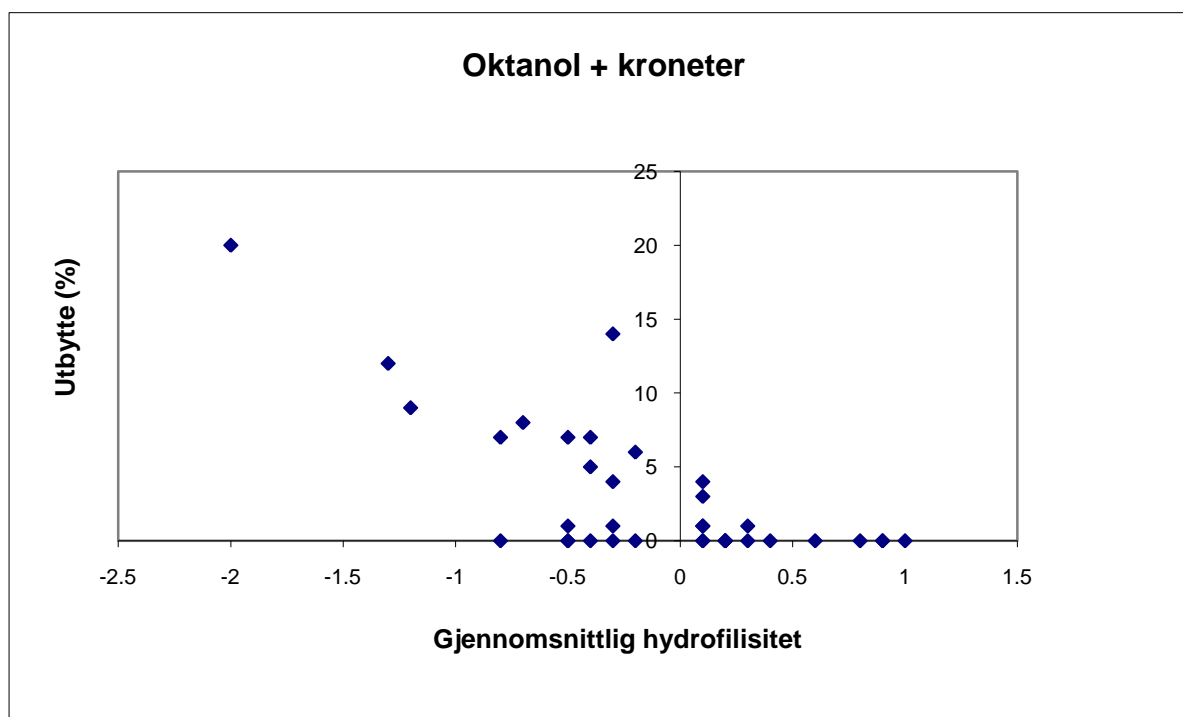
Det faktum at en stor del av peptidene befant seg i væskemembranen etter ekstraksjon ble undersøkt nærmere. Den gjennomsnittlige mengden i organisk fase var 60,1 % blant de 19 peptidene med negative AH-verdier. For peptidene med positive AH-verdier var gjennomsnittet 59,8 %. Andelen peptider som befant seg i membranen kunne dermed ikke korreleres til AH-verdi. Det ble deretter undersøkt hvorvidt netto ladning ved pH 3 kunne ha betydning. For peptidene med netto ladning 0, +1 og +2 var verdiene henholdsvis 3,7 %, 50,1 % og 70,8 %. Dette kunne tyde på at hovedmekanismen for ekstraksjon inn i væskemembranen var basert på ionisk interaksjon med DEHP, og at løsemiddelinteraksjoner hadde mindre betydning. Dette var også i overensstemmelse med at både polare og ikke-polare peptider ble ekstrahert. Denne organiske fasen viste seg altså å gi et mer universelt system enn eugenol.



Figur 6.2: Ekstraksjonsutbytte som funksjon av average hydrophilicity med 55 % (w/w) 1-oktanol + 35 % (w/w) di-isobutylketon + 10 % (w/w) di- (2-etylheksyl) fosfat (DEHP) som organisk fase. Enkelte peptider har samme AH-verdi og utbytte, og vises dermed som ett punkt i figuren.

Væskemembran nr. 3 bestod av 1-oktanol og kroneteren 15-crown-5. Kronetere er kjent for å kunne kompleksere andre stoffer og dermed gi økt løselighet av disse stoffene (21). Det var derfor ønskelig å undersøke effekten av å tilsette en kroneter til membranen. Denne organiske fasen ekstraherte i størst grad de hydrofobe peptidene, som vist i figur 6.3. Blant

peptidene med AH-verdier under 0 var det 68 % som ble ekstrahert. For peptidene med AH-verdier mellom 0 og 0,2 var andelen 40 %, mens for de med AH-verdier over 0,2 var det kun 13 % som lot seg ekstrahere. 1-oktanol + 15-crown-5 viste seg altså å være mer selektiv for de ikke-polare peptidene enn eugenol. Det var imidlertid ikke mulig å korrelere ekstraksjonsutbytter til felles strukturelementer hos peptidene. Det gjennomsnittlige utbyttet for de 19 peptidene med negative AH-verdier var 5 %. Dette var lavere enn med eugenol og 1-oktanol + di-isobutylketon + DEHP. Mengden som var igjen i donorløsningen var gjennomsnittlig 53 %, og 42 % befant seg i væskemembranen. Dette indikerte at 1-oktanol + 15-crown-5 var mindre egnet for elektromembranekstraksjon av peptider. Kompleksering av peptidene med kroneteren var en viktig mekanisme i ekstraksjonsprosessen, men var en svakere interaksjon enn de ioniske interaksjonene med DEHP i væskemembran nr. 2.



Figur 6.3: Ekstraksjonsutbytte som funksjon av average hydrophilicity med 95 % (w/w) 1-oktanol + 5 % (w/w) 15-crown-5 som organisk fase. Enkelte peptider har samme AH-verdi og utbytte, og vises dermed som ett punkt i figuren.

Tabell 6.1: Gjennomsnittlig fordeling av peptidene i de ulike fasene etter ekstraksjon med tre forskjellige væskemembraner

Gjennomsnittlig fordeling av peptidene etter ekstraksjon (%)			
	Donorløsning	Organisk fase	Akseptorløsning
Væskemembran 1 ^a	66	22	12
Væskemembran 2 ^b	30	60	10
Væskemembran 3 ^c	53	42	5

^aBasert på 28 peptider med AH-verdier mellom -2,0 og 0,2

^bBasert på 37 peptider med AH-verdier mellom -2,0 og 1,0

^cBasert på 19 peptider med AH-verdier mellom -2,0 og 0,0

6.2 Andre organiske faser

Det ble innledningsvis gjort ekstraksjonsforsøk med ulike organiske faser. Dette ble gjort ved å ekstrahere løsninger med trypsinert cytokrom c i 5 minutter. Spenningen var 25 V og vibrasjonshastigheten var 900 rpm. Ved analyse av donorløsningen før ekstraksjon ble det identifisert 12 peptider. Donor- og akseptorløsningene ble analysert med LC-MS (singelkvadrupol).

Valg av organiske faser ble delvis basert på tidligere erfaringer med EME (11, 15). Som vist i tabell 6.2 ga de ulike væskemembranene svært forskjellige resultater. Eugenol + 10 % DEHP, 1-oktanol, NPOE og NPOE + 10 % DEHP ga ingen identifiserbare peptider i ekstraktene. Resultatene med 1-oktanol viste at tilsetning av ulike additiver til membranen for å gi økt løselighet lot til å være viktig for denne fasen. DEHP var som tidligere beskrevet en ionpardanner, mens kroneteren kunne kompleksbinde peptidene. TOPO ga mulighet for dannelsen av hydrogenbindinger og dermed økt fluks av analytt gjennom membranen (22), men tilsetning av denne ga lave utbytter. Gjennomsnittlig utbytte for de seks ekstraherte peptidene var 4,8 %. For eugenol viste DEHP imidlertid å ha en negativ effekt. Tilsetning av DEHP til denne fasen ga ingen utbytter. Årsaken til dette var uklar, men kunne kanskje skyldes at DEHP dannet ionpar med peptidene som ga svært god affinitet for eugenol og ikke lot seg ekstrahere ut fra membranen. De organiske fasene som ga de høyeste utbyttene var eugenol og 1-oktanol + IBK + DEHP, med henholdsvis 10,5 % og 21,3 % utbytte i

gjennomsnitt for de ekstraherte peptidene (basert på ett forsøk med tre paralleller for hver organisk fase).

Tabell 6.2: Antall ekstraherte peptider med ulike organiske faser etter ekstraksjon av trypsinert cytokrom c-løsning

Organisk fase	Utbytte
Eugenol	9 peptider
Eugenol + 10 % (w/w) DEHP	Ingen peptider
1-oktanol	Ingen peptider
1-oktanol + 10 % (w/w) DEHP	8 peptider
1-oktanol + 35 % (w/w) IBK + 10 % (w/w) DEHP	9 peptider
NPOE	Ingen peptider
NPOE + 10 % (w/w) DEHP	Ingen peptider
1-oktanol + 5 % (w/w) TOPO	6 peptider
1-oktanol + 5 % (w/w) 15-crown-5	7 peptider

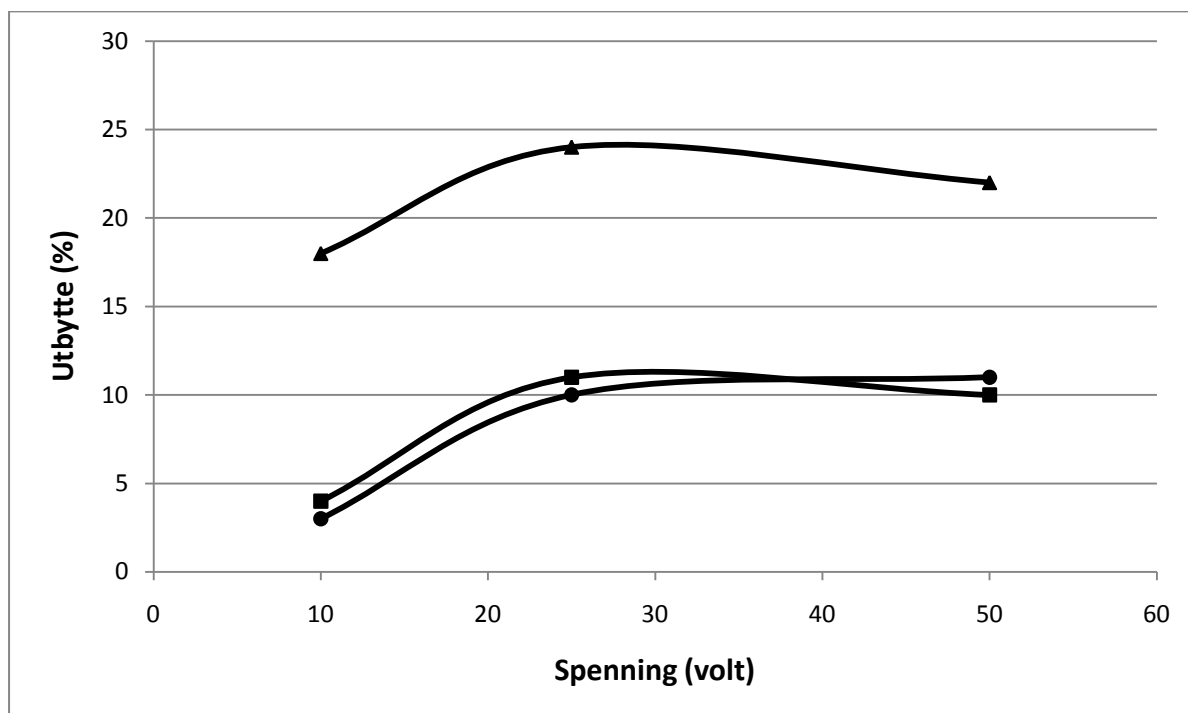
Tabell 6.3 viser utbyttene av tre utvalgte peptider med tilhørende relative standardavvik etter ekstraksjon med tre organiske faser. Standardavvikene viste noe spredning, som var størst for 1-oktanol + IBK + DEHP. Dette kunne skyldes at strømmen var høyere med denne fasen. Sett under ett viste resultatene at væskemembranens sammensetning hadde stor betydning for ekstraksjonsutbyttet av peptidene.

Tabell 6.3: Utbytte av tre peptider med tilhørende relative standardavvik etter ekstraksjon med tre organiske faser. Resultatene er basert på tre paralleller for hver organisk fase.

	Eugenol		1-oktanol + 35 % IBK + 10 % DEHP		1-oktanol + 5 % 15-crown-5	
Peptid	Utbytte	RSD (%)	Utbytte	RSD (%)	Utbytte	RSD (%)
GITWK	8 %	6,4	24 %	15,8	0 %	-
IFVQK	11 %	15,4	21 %	4,3	0 %	-
MIFAGIK	21 %	10,5	8 %	27,6	8 %	15,6

6.3 Spenningens innvirkning på utbyttet

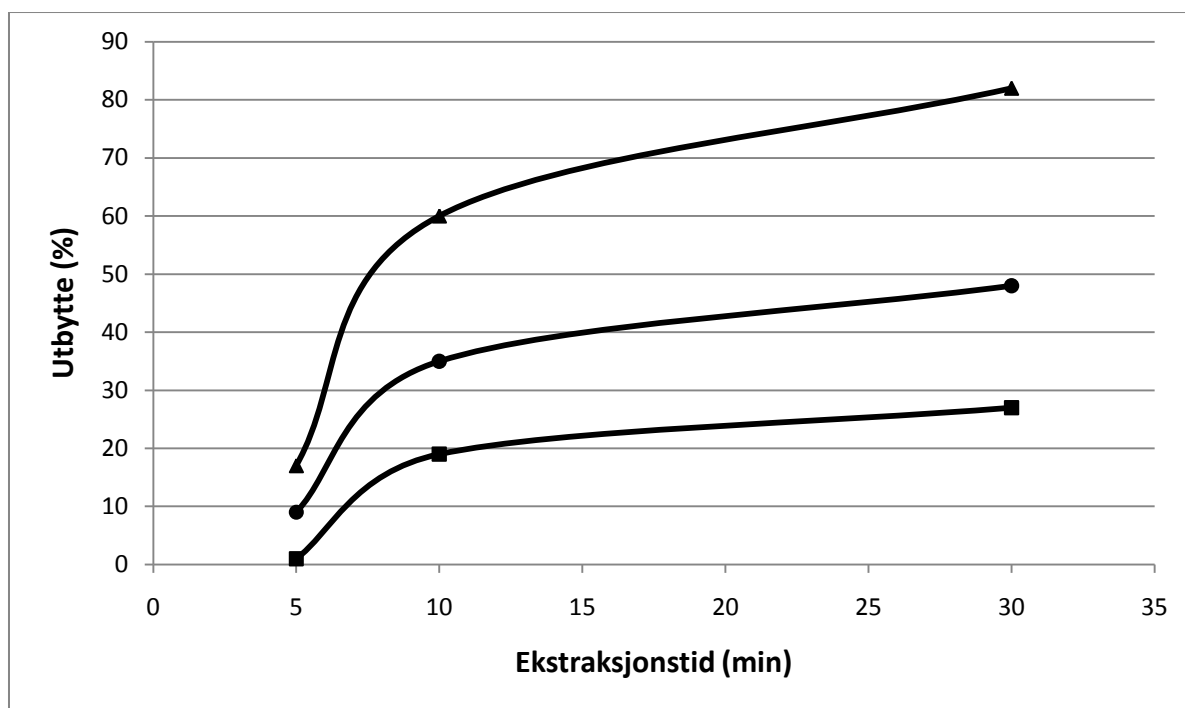
Figur 6.4 viser hvordan utbyttene av tre utvalgte peptider varierte med ulike spenninger. Forsøkene ble utført ved å ekstrahere med 10 V, 25 V og 50 V mens de øvrige parametrene ble holdt konstante. Donorløsningen var trypsinert cytochrom c og den organiske fasen var eugenol. Det ble ekstrahert i 5 minutter der vibrasjonshastigheten var 900 rpm. Som illustrert i figur 6.4 var det en økning i utbyttene fra 10 V til 25 V, mens det ikke var særlige forskjeller mellom 25 V og 50 V. Den samme trenden ble også sett for de øvrige peptidene. For enkelte peptider ble det observert en svak nedgang i utbyttene fra 25 V til 50 V. Det kunne dermed synes som at spenningen ikke burde være for høy, men at 25 V var det mest optimale. Denne trenden med avtagende utbytter etter et visst punkt er også observert i tidligere forsøk med EME og peptider (11).



Figur 6.4: Ekstraksjonsutbytte av tre ulike peptider (GITWK (■), IFVQK (●) og MIFAGIK (▲)) som funksjon av pålagt spenning

6.4 Ekstraksjonstidens innvirkning på utbyttet

Det ble også undersøkt hvilken innvirkning ekstraksjonstiden hadde på utbyttet. Ekstraksjonsbetingelsene var som beskrevet i avsnitt 6.3, bortsett fra at spenningen var 25 V. Det ble gjort forsøk der det ble ekstrahert i 5, 10 og 30 minutter. Figur 6.5 viser at utbyttene økte med økende ekstraksjonstid for tre utvalgte peptider. Det samme gjaldt for de andre peptidene. Økningen var størst fra 5 til 10 minutter, mens utbyttene flatet mer ut opp til 30 minutter. Som illustrert i figur 6.5 ga det ene peptidet (MIFAGIK) et utbytte på over 80 % etter 30 minutter ekstrahering. For flere andre peptider lå utbyttene på rundt 50 %. Dette viste at det var mulig å oppnå relativt høye utbytter.



Figur 6.5: Ekstraksjonsutbytte av tre ulike peptider (GITWK (■), IFVQK (●) og MIFAGIK (▲)) som funksjon av ekstraksjonstid

6.5 Effekt av heptansulfonsyre som ionpardanner

Siden utbyttene av peptidene var relativt lave, var det ønskelig å undersøke om det fantes muligheter for å øke disse. Det er tidligere vist at alkylsulfonsyrer øker løseligheten av peptider i organiske løsemidler (23). Dette er stoffer som kan danne ionpar med analyttene og dermed gi økt løselighet. Det er også gjort forsøk med blant annet heptansulfonsyre innenfor LPME som har vist å gi økte utbytter av både peptider og basiske legemidler (24, 25). Derfor ble det i dette arbeidet valgt å undersøke om heptansulfonsyre kunne ha innvirkning på utbyttet.

Donorløsningen var trypsinert cytochrom c som ble tilsatt 500 mM heptansulfonsyre slik at konsentrasjonen av sulfonsyren i donorløsningen ble 50 mM. Dette var basert på tidligere forsøk med peptider der det ble funnet at 50 mM heptansulfonsyre var den konsentrasjonen som ga høyest utbytter (24). Forsøket ble her utført med eugenol som organisk fase og spenningen var 25 V. Det ble ekstrahert i 5 minutter med 900 rpm som vibrasjonshastighet. Tilsetning av heptansulfonsyre viste imidlertid ikke å ha særlig innvirkning på utbyttet. Dette

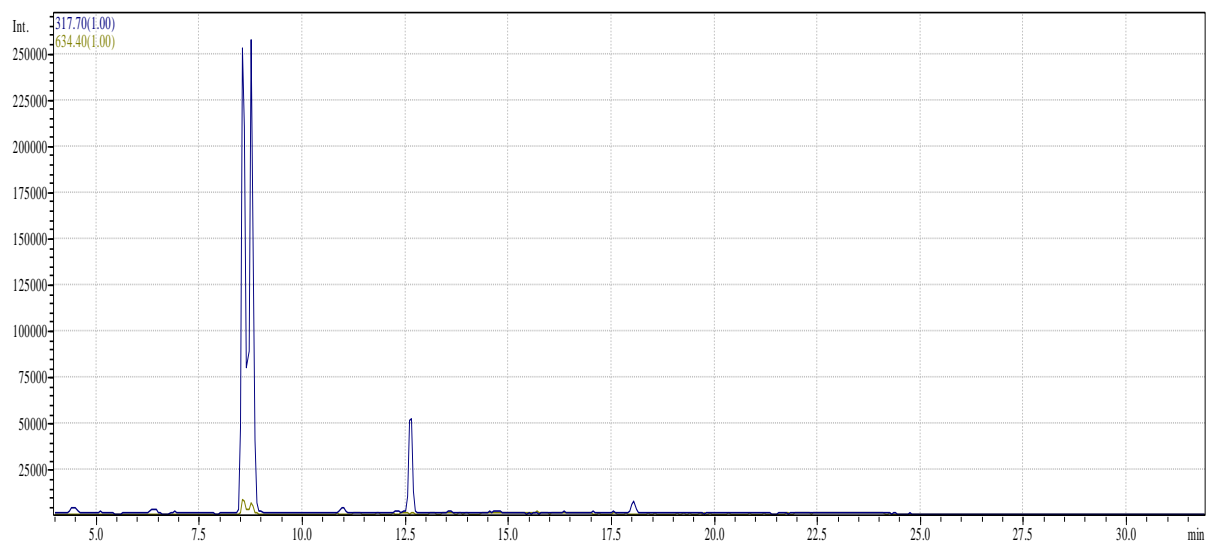
er vist i tabell 6.4 for tre utvalgte peptider. Den samme trenden gjaldt også for de øvrige peptidene.

Tabell 6.4: Utbytte av tre ulike peptider etter ekstraksjon med og uten heptansulfonsyre i donorløsningen

Peptid	Utbytte uten heptansulfonsyre (%)	Utbytte med heptansulfonsyre (%)
GITWK	11	9
IFVQK	10	11
MIFAGIK	24	19

6.6 Det organiske løsemidlets innvirkning på den kromatografiske separasjonen

Som vist i figur 6.6 ble det av og til observert at toppene i kromatogrammene var splittet for enkelte peptider. Dette gjaldt ekstraksjonene der det ble brukt oktanol i væskemembranen. Derfor var det ønskelig å undersøke om dette kunne skyldes at noe av det organiske løsemidlet lekket ut i akseptorløsningen under ekstraksjon og påvirket retensjonen under den kromatografiske separasjonen. Dette ble gjort ved å blande like mengder 10 mM HCOOH og oktanol + 10 % (w/w) DEHP før sentrifugering. Deretter ble trypsinert cytochrom c-løsning fortynnet med vannfasen og analysert. I tillegg ble 1 mL 10 mM HCOOH tilsatt ~ 10 µL oktanol + DEHP for å mette vannfasen med organisk løsemiddel, og trypsinert cytochrom c-løsning ble fortynnet med denne løsningen før analysering. De samme forsøkene ble gjort med eugenol for sammenligning. I tillegg ble det analysert en standardløsning med trypsinert cytochrom c som kun var fortynnet med HCOOH. Det ble ikke observert topper som var splittet i kromatogrammene for standarden eller prøvene med eugenol. I prøvene med oktanol + DEHP var det derimot tre peptider som ga såkalte dobbelttopper. Ut fra dette lot det til at man kunne konkludere med at de splittede toppene skyldtes påvirkning fra det organiske løsemidlet.



Figur 6.6: Massekromatogram som viser splittet topp for et peptid etter ekstraksjon med oktanol + DEHP

7. Konklusjon

Denne oppgaven har vist at et bredt spekter av peptider kan ekstraheres med elektromembranekstraksjon ved ulike betingelser. Det ble ekstrahert både ikke-polare og polare peptider med AH-verdier mellom -2,0 og +1,0, og peptider bestående av mellom 3 og 16 aminosyrer. Eugenol som væskemembran ga et generelt system for ikke-polare peptider med AH-verdier under 0,2. Med eugenol var løsemiddelinteraksjoner viktig for ekstraksjon av peptidene inn i membranen. 1-oktanol + di-isobutylketon + di- (2-etylheksyl) fosfat (DEHP) viste å gi et system som ekstraherte både ikke-polare og polare peptider. Ioniske interaksjoner mellom peptidene og DEHP tydet på å være viktig for transport av peptidene inn i denne membranen. Et mer selektivt system for de ikke-polare peptidene med AH-verdier under 0 ble oppnådd med væskemembranen bestående av 1-oktanol + 15-crown-5. Kompleksdannelse mellom peptidene og kroneteren var sannsynligvis viktig for ekstraksjonsprosessen.

Dette arbeidet har vist at noe selektivitet kan oppnås ved endring i væskemembranens sammensetning. Det ble også vist at spenningen og ekstraksjonstiden påvirker ekstraksjonsutbyttet. Mer forskning trengs for å få økt kunnskap om hvordan peptidenes kjemiske egenskaper påvirker utbyttet ved gitte ekstraksjonsbetingelser, men resultatene har vært med på å underbygge at elektromembranekstraksjon har potensial til å bli en viktig framtidig prøveopparbeidelsesmetode for peptider.

8. Kildeliste

1. **Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.:** *Legemiddelanalyse*. Fagbokforlaget, 2004.
2. **Jönsson, J.Å., Mathiasson, L.:** Membrane-based techniques for sample enrichment. *Journal of Chromatography A*. 902: 205-225, (2000).
3. **Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.:** Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*. 1184: 132-142, (2008).
4. **Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.:** Liquid-liquid-liquid microextraction (LLLME) for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 71: 2650-2656, (1999).
5. **Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S., Krogh, M., Ugland, H.G., Grønhaug, T.:** Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device (LPME) for drug analysis compatible with both capillary gas chromatography, capillary electrophoresis, and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 873: 3-11, (2000).
6. **Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.:** Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A*. 1109: 183-190, (2006).
7. **Balchen, M., Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S.:** Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane. *Journal of Chromatography A*. 1152: 220-225, (2007).
8. **Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.:** Extraction across supported liquid membranes by use of electrical fields. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 388: 521-523, (2007).
9. **Gjelstad, A., Andersen, T.M., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S.:** Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields. *Journal of Chromatography A*. 1157: 38-45, (2007).

-
10. **Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S.:** Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 393: 921-928, (2009).
 11. **Balchen, M., Reubsaet, L., Pedersen-Bjergaard, S.:** Electromembrane extraction of peptides. *Journal of Chromatography A*. 1194: 143-149, (2008).
 12. **Visser, N.F.C., Lingeman, H., Irth, H.:** Sample preparation for peptides and proteins in biological matrices prior to liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382: 535-558, (2005).
 13. **Causon, R.C., McDowall, R.D.:** Sample pretreatment techniques for the bioanalysis of peptides. *Journal of Controlled Release*. 21: 37-48, (1992).
 14. **Herraiz, T., Casal, V.:** Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. *Journal of Chromatography A*. 708: 209-221, (1995).
 15. **Balchen, M., Halvorsen, T.G., Reubsaet, L., Pedersen-Bjergaard, S.:** Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction. *Journal of Chromatography A*. 1216: 6900-6905, (2009).
 16. **Kjelsen, I.J.Ø.:** *Elektromembranekstraksjon ved lav spenning - utvikling og optimalisering av organiske membraner*. Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, 2007.
 17. **Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S.:** Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation. *Journal of Chromatography A*. 1174: 104-111, (2007).
 18. **Middelthon-Bruer, T.M., Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S.:** Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs. *Journal of Separation Science*. 31: 753-759, (2008).
 19. **Hauge, J.G., Aakvaag, R.K., Christensen, T.B.:** *Biokjemi*. Universitetsforlaget, 4. utgave, 2001.
 20. **Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H.:** Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*. 177: 39-54, (2002).

21. **Yazdi, A.S., Mofazzeli, F., Es'haghi, Z.:** Determination of 3-nitroaniline in water samples by directly suspended droplet three-phase liquid-phase microextraction using 18-crown-6 ether and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1216: 5086-5091, (2009).
22. **Shen, Y., Grönberg, L., Jönsson, J.Å.:** Experimental studies on the enrichment of carboxylic acids with tri-n-octylphosphine oxide as extractant in a supported liquid membrane. *Analytica Chimica Acta*. 292: 31-39, (1994).
23. **Adjei, A., Rao, S., Garren, J., Menon, G., Vadrere, M.:** Effect on ion-pairing on 1-octanol-water partitioning of peptide drugs. I: The nonapeptide leuprolide acetat. *International Journal of Pharmaceutics*. 90: 141-149, (1993).
24. **Gjelstad, A.:** *Selektiv væskefasemikroekstraksjon av angiotensin I, II og III i humant plasma*. Kjemisk seksjon, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, 2004.
25. **Ho, T.S., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.:** Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*. 44: 308-316, (2006).

9. Appendiks

Peptid	Aminosyresekvens	Antall amino- syrer	MW	Netto ladning pH 3.0	pI	Gjennom- snittlig hydrofilisitet ^a	Ratio hydrofile amino- syrer/ totalt ant. aminosyrer (%)	Massebalanse (%)		
								Okt + 15- crown- 5	Eugenol	Okt + IBK + DEHP
Ile-Pro-Ile	IPI	3	341.5	0	6	-1.2	0	46 ^b 46 ^c 9 ^d	48 37 15	49 37 14
Endomorfin	YPWF	4	610.7	1	9.9	-2	0	11 69 20	9 88 3	16 77 6
CC4	IFVQK	5	633.8	1	10.1	-0.5	40	65 35 0	63 25 12	39 44 17
CC6	GITWK	5	603.7	1	10.1	-0.5	20	57 43 0	14 85 2	17 71 11
Enkefalin	YGGFL	5	555.6	0	5.9	-1.3	0	28 60 12		27 64 9
CC1	YIPGTK	6	677.8	1	9.7	-0.2	17	70 30 0	100 -17 17	78 -2 24
CC3	KIFVQK	6	762	2	10.6	0.1	50	73 27 0	90 -4 14	23 58 19
Neurotensin 1-6	ELYENK	6	794.9	1	4.3	0.9	67	55 45 0	86 12 2	78 20 1
Angiotensin 3	RVYIHPF	7	931.1	2	9.8	-0.8	14	34 59 7	30 53 17	9 84 7
BSA4	YLYEIAR	7	927.1	1	6.8	-0.4	29	44 51 5	62 24 14	23 67 10
CC2	KYIPGTK	7	806	2	10.2	0.2	29	71 29 0	90 0 10	32 50 18
CC7	MIFAGIK	7	779	1	10.1	-0.7	14	57 36 8	49 29 22	5 94 1
Angiotensin 2 antipeptid	EGVYVHPV	8	899	1	5.1	-0.5	13	52 48 1	55 32 12	46 42 12
Angiotensin 2	DRVYIHPF	8	1046.2	2	7.8	-0.3	25	49 47 4	108 -33 25	10 77 13

Peptid	Aminosyresekvens	Antall amino-syrer	MW	Nettoladning pH 3.0	pI	Gjennomsnittlig hydrofilisitet	Ratio hydrofile aminosyrer/ totalt ant. aminosyrer (%)	Massebalanse (%)		
								Okt + 15-crown-5	Eugenol	Okt + IBK + DEHP
BSA1	DLGEEHFK	8	974	2	4.4	0.9	50	61 39 0	68 32 0	40 36 24
BSA3	AEFVEVTK	8	922	1	4.3	0.3	38	78 22 0	88 12 0	69 22 9
CC9	EDLIAYLK	8	964.1	1	4.1	0.1	38	74 22 4	96 3 1	26 61 13
Neurotensin 1-8	pELYENKPR	8	1029	2	7	1	63	48 52 0	73 20 7	65 30 4
Bradykinin	RPPGFSPFR	9	1060.2	2	12.4	0.1	33	49 48 3	27 58 15	13 68 19
Vasopressin	CYFQNCPRG	9	1086.3	2	9.1	-0.4	33	47 53 0	51 29 20	53 40 6
Angiotensin 1	DRVYIHPFHL	10	1296.5	3	7.9	-0.5	20	22 71 7	18 66 16	0 91 9
BSA6	LVVSTQTALA	10	1002.2	0	6	-0.8	20	85 15 0	101 -1 0	104 -5 1
BSA10	LVNELTEFAK	10	1163.3	1	4.3	0.1	40	78 21 1	84 6 10	43 37 19
BSA11	KQTALVELLK	10	1142.4	2	9.9	0.1	40	65 34 1	79 17 4	11 73 17
BSA8	HPEYAVSVLLR	11	1283.5	2	7.8	-0.3	27	70 30 0	80 -4 24	0 93 7
BSA5	HLVDEPNLIK	11	1305.5	2	5.2	0.2	45	76 24 0	124 -37 13	0 97 3
CC8	TGPNLHGLFGR	11	1168.3	2	11	-0.3	18	76 23 1	66 8 27	3 91 6
BSA13	SLHTLFGDELcK	12	1420.7	2	4.4	0.3	42	70 29 1	78 21 1	0 95 5

Peptid	Aminosyresekvens	Antall amino-syrer	MW	Netto ladning pH 3.0	pI	Gjennom-snittlig hydrofilisitet	Ratio hydrofile aminosyrer/ totalt ant. aminosyrer (%)	Massebalanse (%)		
								Okt + 15-crown-5	Eugenol	Okt + IBK + DEHP
BSA2	YIcDNQDTISSK	12	1444.6	1	3.7	0.6	67	72 28 0	96 4 0	53 47 0
BSA12	LGEYGFQnALIVR	13	1480.7	1	4.1	-0.2	31	75 19 6	84 -6 22	42 35 24
BSA14	LGEYGFQNALIVR	13	1479.7	1	6.9	-0.4	31	60 33 7	65 35 0	31 52 17
BSA16	DAFLGSFLYEYSR	13	1567.7	1	4.1	-0.3	38	47 39 14	64 19 17	15 82 3
CC10	EETLMEYLENPKK	13	1623.8	2	4.3	0.8	54	84 16 0	84 16 0	3 96 1
BSA7	KVPQVSTPTLVEVSR	15	1639.9	2	10.1	0.1	40	77 23 0	116 -16 0	23 73 4
CC5	KTGQAPGFTYTDANK	15	1598.7	2	9.6	0.2	33	79 21 0	88 12 0	51 48 1
BSA9	RPcFSALTPDETYVPK	16	1881.9	2	4.4	0.4	38	74 26 0	88 12 0	17 75 7
BSA15	LFTFHADicTLPDTEK	16	1908.9	2	4.1	0.2	31	70 30 0	80 20 0	0 91 9

^aGjennomsnittlig hydrofilisitet ble funnet ved hjelp av Innovagen peptidkalkulator (www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp)

Verdien ble i dette dataverktøyet beregnet ved å bruke hydrofilisiteten til hver aminosyre, basert på Hopp og Woods-skalaen, og deretter å kalkulere den gjennomsnittlige hydrofilisiteten.

^bMengde peptider som befant seg i donorfase i %

^cMengde peptider som befant seg i organisk fase i %

^dMengde peptider som befant seg i akseptorfase i % (utbytte)